TP N°1 DE BIOLOGIE CELLULAIRE : INITIATION A LA MICROSCOPIE

Introduction :

L'œil humain ne peu distinguer des objets mesurant moins de 0,2 mm. Le microscope devient donc nécessaire pour l'observation de certains éléments biologiques et organismes dont les dimensions sont de l'ordre de micron (µm). Le problème fondamental, que les biologistes ont eu à résoudre lors de l'étude des cellules, est leur petite taille qui ne permet pas de les observer à l'œil nu. Par conséquent, les connaissances sur les cellules ont progressés avec la mise au point d'instruments d'observation (microscopes), de plus en plus perfectionnés, ainsi qu'avec l'élaboration de techniques appropriées. Le développement de la cytologie est donc lié aux progrès techniques accomplis dans le domaine de l'optique. En effet, si les lentilles optiques (loupes) étaient déjà connues du temps des Grecs, les premiers microscopes, composés des 02 lentilles, n'ont été mis au point qu'à la fin du 16ème siècle.
Le microscope est un appareil optique muni de lentilles qui permet de grossir l'image et donc de voir de petits détails. Il est surtout utilisé en biologie, pour observer les cellules, les tissus.
Un certain nombre de règles de base sont à respecter dès la première observation: les habitudes se gardent, même les mauvaises.

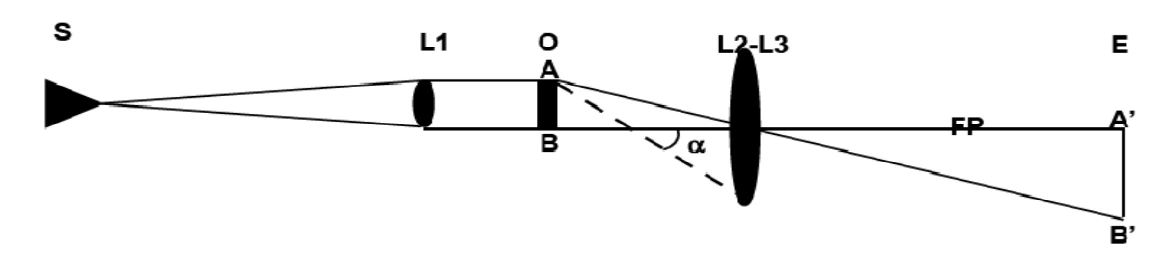
1- Définition :

Le mot microscope est composé de 02 racines étymologiques différentes, du Grec (micro= petit et scopein= voir). Le microscope est un instrument optique permettant d'observer des objets très minces (qui peuvent être traversés par la lumière) en les grossissant (32 à 1000 X). L'objet à observer appelé préparation est entre une lame et une lamelle de verre.
Il existe d'autres microscopes, dits microscopes électroniques, qui permettent des grossissements plus importants.

2- Principe physique du microscope optique :

Cet instrument rapproche donc les objets de notre œil en nous permettant de les observer.
Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :
- soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.
- soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.
- soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

Le microscope photonique utilisent un flux ondulatoire de particules (FP) non chargées, les *photons*, au travers d'un système de lentilles (L1, L2 et L3) de manière à former d'un objet (O) à étudier (AB) une image agrandie (A'B') sur un écran E



S : source de lumière
L1 : lentille condensatrice
O : objet à étudier de dimension AB
a **:** Demi-angle d'ouverture de l'objectif
L2, L3 : respectivement l'objectif et l'oculaire
FP : faisceau de particule
E : écran permettant de voir l'image A'B' obtenue de l'objet O à étudier.

3- fonctionnement du microscope :

La plupart des cellules sont très petites pour être observées à l'œil nu. Le microscope optique permet d'obtenir des grossissements de l'ordre de 1000.
Dans le cadre de la microscopie optique classique, la préparation à observer est déposée sur la platine du microscope. Posée sur une plaquette de verre appelée porte objet ou lame et couverte d'un couvre objet ou lamelle, la préparation est maintenue en place par deux pinces ou valets.
La lumière fournie par une lampe ou miroir, est concentrée par le condensateur avant de traverser l'objet. La lumière transmise est captée par l'un des objectifs du microscope. Ces objectifs sont montés sur une pièce tournante appelée tourelle revolver. Finalement l'image agrandie par l'objectif parcourt le tube porte oculaire et est encore magnifiée par l'oculaire sur lequel l'observateur pose son œil. Le grossissement de l'oculaire multiplié par celui de l'objectif fournit le grandissement total de l'image par le microscope.
La mise au point s'effectue à l'aide d'une ou plusieurs vis de réglages : vis macro métrique pour le réglage grossier et la vis micrométrique pour le réglage fin.

* Remarques :
1) Il est à signaler que l'examen des échantillons biologiques au microscope optique doit répondre à deux exigences :
- Les objets à examiner doivent être minces
- Leurs différents éléments doivent présenter un certain contraste.

2) Il est à noter qu'un bon éclairage est essentiel si on veut faire de bonnes observations. Selon un principe d'optique on obtient une meilleure résolution quand le condensateur et l'objectif sont couplés, c'est-à-dire quand ils ont la même ouverture numérique. Pour y arriver il suffit :
- de faire la mise au point sur le spécimen à observer.
- de fermer le diaphragme et de l'ouvrir lentement jusqu'à ce que la lentille postérieure de l'objectif soit remplie de lumière.

4- Présentation du microscope optique :

Le microscope optique classique se compose de 02 parties essentielles :

*** Un système optique**

*** Une partie mécanique**

a)- Système optique :

Il comporte l'oculaire, l'objectif et le système d'éclairage (source lumineuse).

L'oculaire : c'est la lentille supérieure au niveau de laquelle nous plaçons notre œil lors de l'observation.

L'objectif : c'est la lentille inférieure qui nous rapproche de la préparation à examiner, il y a habituellement 03 objectifs correspondant aux grossissements 10X, 40X, 100X, ils sont interchangeables par simple rotation de leur base commune (tourelle revolver).

Système d'éclairage : il se compose d'une source lumineuse (lampe ou miroir). L'objet à examiner est éclairé par transparence du condensateur qui est menu à sa base par un diaphragme qui permet de varier l'ouverture du faisceau éclairant.

b)- partie mécanique :

La partie mécanique comporte les éléments suivants : un pied, une potence, une platine une crémaillère et la vis macro et micrométrique.

Le pied : il permet d'assurer la stabilité du microscope.

La potence : c'est le bras de l'appareil qui supporte le tube optique et la platine.

La platine : c'est le plateau ou l'on fixe la lame à examiner au moyen des valets. La platine est équipée d'une ouverture permettant le passage des rayons lumineux.

La crémaillère : commandée par un ou deux boutons (vis macro et micrométrique).

La vis macro et micrométrique : permet des mouvements rapides et de grande amplitude du tube optique tan disque la vis micrométrique communique au tube optique un mouvement lent et de faible amplitude

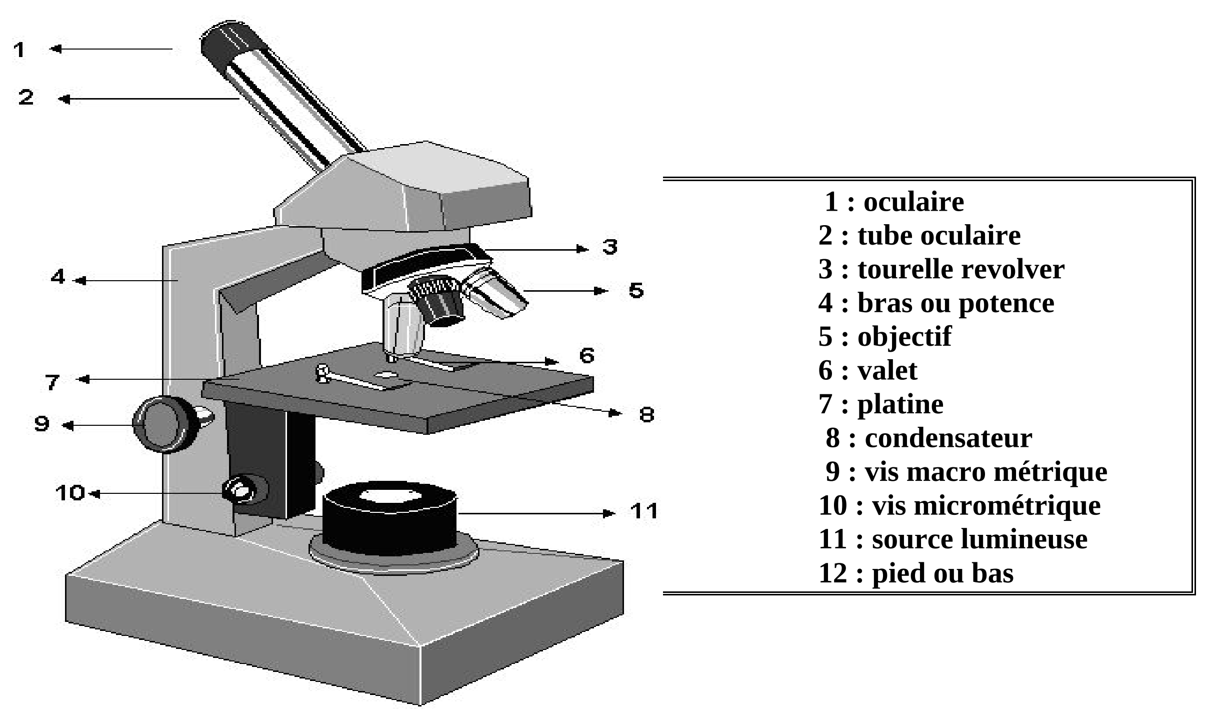


Schéma d'un microscope optique monoculaire

On peut classer les différentes parties d’un microscope selon leur fonction en cinq catégories :

- **Fonction de maintien de la préparation :** le maintien de la préparation microscopique est assuré par la platine et les deux valets.
- **Fonctions de grossissement de la préparation :** on distingue dans cette catégorie les éléments suivants :
  - **L'oculaire** grossit la préparation comme une loupe. Un chiffre gravé dessus indique son pouvoir grossissant (ex : X12).
  - **Les objectifs** : Ils sont en général au nombre de 3 et situés à l'extrémité inférieure du tube optique. Ils complètent le système grossissant. Sur chacun d'eux, un chiffre indique le pouvoir grossissant (ex. x40, x100). Pour en changer, il suffit de tourner le revolver.
- **Fonction d’éclairage de la préparation :** l’éclairage de la préparation microscopique est assuré par une **lampe** halogène qui envoie la lumière vers la préparation microscopique via le condenseur. La lumière traverse l'objet et "emporte" son image vers des lentilles de verre (placées dans l'objectif et l'oculaire) qui l'agrandissent. C'est en plaçant son œil sur l'oculaire que l'on voit cette image.
- **Fonction de mise au point :** La mise au point s'effectue en tournant la vis macrométrique qui permet les mouvements rapides et importants du tube optique. Cette mise au point est souvent complétée par l'utilisation de la vis micrométrique dont la rotation assure des mouvements très lents (invisible à l'œil nu) du tube optique.
- **Fonction de soutien :** La potence supporte l'ensemble des pièces du microscope (tube optique, platine et miroir). Souvent, il est possible de l'incliner par rapport à la base ou socle qui reste fixe et qui maintient le microscope sur la table.

5- Mode opératoire :

Disposer sur la platine une lame portant un objet suffisamment contrasté (lame déjà préparée). Cette lame montée de façon permanente, constitue un bon test chaque fois que l'on aura complètement déréglé son éclairage ou que l'on utilisera un nouveau microscope.
Deux possibilités se présentent selon que l'on possède un éclairage externe par miroir ou un éclairage intégré.
Pour l'éclairage par miroir, diriger la lumière d'une ampoule dépolie sur la préparation en basculant le miroir. Dans le cas d'un éclairage intégré, mettre simplement sous tension et régler le rhéostat sur une valeur moyenne ou faible.
Ouvrir les diaphragmes à moitié.
Positionner le condenseur à mi course
Mettre en place l'objectif le plus faible (par exemple celui qui est marqué 10 X) en faisant attention à ce que le clique soit bien enclenché dans le cas d'un objectif monté sur revolver.

Chaque objectif de microscope à sa propre distance de mise au point, d'autant plus courte que l'objectif est puissant. Certains objectifs montés sur revolver sont équilibrés entre eux, c'est à dire que quand la mise au point est faite pour l'un, elle l'est aussi quand on en positionne un autre.
Méfiez-vous, il peut arriver qu'un objectif soit dépareillé ou bien légèrement dévissé ou qu'entre temps on ait mis une lame plus épaisse et on risque l'accident. D'autre part certains objectifs sont munis d'un système "pare-choc", ce n'est pas une protection absolue ! A l'aide du mouvement rapide, et en tenant la tête sur le côté du microscope, les yeux à

hauteur de la platine, positionner l'objectif à une distance de la préparation éclairée, légèrement inférieure à la distance focale de l'objectif.
Maintenant, et uniquement maintenant, mettre l'œil à l'oculaire. Sans toucher à la mise au point, améliorer l'éclairage puis toujours l'œil à l'oculaire, à l'aide du mouvement rapide, éloigner l'objectif de la préparation d'une petite quantité ne s'éloignant pas trop de la distance théorique de mise au point.
Des ombres sombres de plus en plus nettes doivent apparaître, puis l'image. En cas d'échec recommencer la série d'opération de pré-mise au point. Recentrer éventuellement votre aile de mouche. L'image étant obtenue, vous pouvez utiliser le mouvement lent.

Règles à respecter.

Utiliser une préparation bien contrastée (lame préparée) !
Eclairer convenablement la préparation !
Faire une pré-mise au point l'oeil à la hauteur de la platine !
Commencer toujours une observation avec le plus faible grossissement !
Ne pas essayer d'utiliser pour le moment l'objectif à immersion !!

6- Entretien du microscope :

Le microscope, même le plus simple, est un instrument merveilleux, fruit de recherches de nombreux savants au cours des siècles .Il n'a cessé d'évoluer pour atteindre aujourd'hui un quasi perfection. Il comprend des parties mécaniques d'une très grande précision et des optiques tout aussi fragiles.
Référez-vous à son mode d'emploi fourni, pour connaître la manière de le déplacer et de l'entretenir. Par exemple il est généralement recommandé de le soulever par sa potence et non par le tube optique ou la platine ce qui pourrait endommager les mécanismes délicats.

La saleté sous toutes ses formes est le pire ennemi du microscope. Un microscope sale reflète un mauvais entretien. Pour enlever la poussière sur les pièces optiques sales, utiliser un pinceau. Si les lentilles sont couvertes de saletés tenaces (huile à immersion, empreintes digitales séchées…..), utiliser du papier à lentille.
La platine ainsi que les autres pièces mécaniques à leur tour doivent être toujours propres, pour cela, on recommande qu'après usage de bien recouvrir le microscope avec un cache poussière approprié.

7- But du TP :

Le but de ce TP est de mettre l'étudiant devant un instrument qui l'accompagnera durant toute sa formation, pour cela, il est donc indispensable de le familiariser à cet outil de travail.
Pour cela, il est indispensable de lui faire une présentation des différentes pièces dont il est composé ainsi que les réglages nécessaires pour obtenir une bonne mise au point.

8- travail à faire :

Donner à l'étudiant une lame préparée afin de s'exercer et de s'assurer qu'il maitrise parfaitement les différents réglages.